

Liposomes encapsulating antiviral drugs

Publication number: BR9509217

Publication date: 1998-01-27

Inventor: BERGERON MICHEL G (CA); DESORMEAUX ANDRE (CA)

Applicant: BERGERON MICHEL G (CA); DESORMEAUX ANDRE (CA)

Classification:






- international: A61K9/127; A61K31/47; A61K31/4725; A61K31/52; A61K31/66; A61K31/70; A61K31/7056; A61P31/12; A61P31/18; A61K9/127; A61K31/47; A61K31/472; A61K31/519; A61K31/66; A61K31/70; A61K31/7042; A61P31/00; (IPC1-7): A61K31/00; A61K9/127

- european: A61K9/127; A61K9/127B; A61K31/4725; A61K31/52L; A61K31/66H; A61K31/70R10P5H; A61K31/70R10P5P; A61K31/70R10P10L; A61K31/7056

Application number: BR19950009217 19951003

Priority number(s): WO1995CA00561 19951003; US19940316735 19941003

Also published as:

 WO9610399 (A1)
 EP0784470 (A1)
 US5773027 (A1)
 EP0784470 (A0)
 EP0784470 (B1)

[more >>](#)

[Report a data error here](#)

Abstract not available for BR9509217

Abstract of corresponding document: **US5773027**

A method is disclosed for the treatment of viral diseases comprising the administration of antiviral agents encapsulated in liposomes. Also provided are formulations of liposomes for the treatment of viral diseases and more particularly for the treatment of infections caused by viruses like human immunodeficiency virus (HIV) and cytomegalovirus (CMV). These formulations of liposomes are composed of specific classes of lipid components and contain an entrapped drug effective against the viral disease. These liposomal formulations of antiviral drugs allow high cellular penetration in different cell lines, good in vitro antiviral efficacy against HIV and CMV replication, efficient in vivo targeting of HIV reservoirs and a marked improvement of the pharmacokinetics of drugs.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



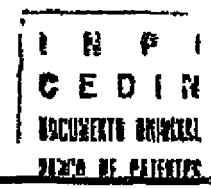
REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Ministério da Indústria, do Comércio e do Turismo
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) (21) **PI 9509217-0 A**

(51) Int. Cl.⁵:
A61K 31/00
A61K 9/127

(22) Data de Depósito: 03/10/95

(43) Data de Publicação: 27/01/98 (RPI 1414)



(54) Título: **Processo e formulações para tratamento de aids e várias outras doenças virais.**

(30) Prioridade Unionista: 03/10/94 US 09/316,735

(71) Depositante(s): Michel G. Bergeron (CA), Andre Desormeaux (CA)

(72) Inventor(es): Michel G. Bergeron; Andre Desormeaux

(74) Procurador: Tavares & Cia

(86) Pedido Internacional: PCT CA 95/00561 de 03/10/95.

(87) Publicação Internacional: WO 96/10399 de 11/04/96

(57) **Resumo:** Patente de Invenção para "PROCESSO E FORMULAÇÕES PARA TRATAMENTO DE AIDS E VÁRIAS OUTRAS DOENÇAS VIRAIS". Um processo é revelado para o tratamento de doenças virais compreendendo a administração de agentes antivirais encapsulados em lipossomas. Também provido são formulações de lipossomas para o tratamento de doenças virais, e, mais particularmente, para o tratamento de infecções causadas por víruses similares ao vírus da imunodeficiência humana (HIV) e citomegalovírus (CMV). Estas formulações de lipossomas são compostas de classe específicas de componentes de lipídeo, e contêm uma droga presa efetiva contra a doença antivirais permitem alta penetração celular em linhas de células diferentes. boa eficácia antiviral in vitro contra duplicação de HIV e CMV, eficiente objetivação in vivo de reservatório de HIV, e um aperfeiçoamento marcado nas farmacocinéticas de drogas.

Relatório Descritivo da
Patente de Invenção para "PROCESSO E FORMULAÇÕES
PARA TRATAMENTO DE AIDS E VÁRIAS OUTRAS DOENÇAS
VIRAIS".

05 Esta invenção se refere a
formulações de liposomas e processo para uso no
tratamento de doenças virais, e particularmente no
tratamento de infecções causadas por viroses
similares a vírus de imunodeficiência humana e
10 citomegalovírus.

 Muitos agentes antivirais tem
sido desenvolvidos para o tratamento de pacientes
com infecção de vírus de imunodeficiência humana
(HIV). Contudo, somente benefícios temporários e
15 limitados são observados em pacientes infectados com
HIV tratados com qualquer dos antiretrovirais atuais
ou combinações dos mesmos. A capacidade limitada
destes agentes para diminuir a carga viral, o rápido
desenvolvimento de resistência e os efeitos laterais
20 tóxicos de muitas drogas têm limitado sua eficácia
por longo tempo. Um problema maior associado com a
administração de agentes antivirais em pacientes é
sua pobre capacidade em penetrar e atingir as
células infectadas. A liberação rápida da droga e a

toxicidade de compostos de origem ou metabolitos constituem também alguns dos maiores problemas que pode retardar o desenvolvimento e uso de muitos agentes antivirais. Dada a severa toxicidade de

05 agentes antivirais atualmente disponível para tratar AIDS e outras doenças virais e sua capacidade limitada para atingir as células infectadas, as estratégias auxiliadas no alcance de níveis terapêuticos de drogas em células infectadas e

10 redução da toxicidade devem ser exploradas. O prendimento de drogas nos liposomas constitui uma aproximação atrativa para aperfeiçoar a distribuição de agentes ativos em células infectadas, e para reduzir os efeitos tóxicos associados com sua

15 administração. Liposomas são vesículas microscópicas em que uma variedade de drogas pode ser incorporada. Por causa da similaridade dos componentes primários de liposomas com membranas naturais, os liposomas são geralmente não-tóxicos e biodegradáveis. Nós

20 acreditamos que uma melhor compreensão da função dos liposomas como transportadores de agentes antivirais podem conduzir a novas estratégias que podem aperfeiçoar a eficácia e segurança de drogas usadas para o tratamento de AIDS e outras doenças virais.

25 Existe agora muita evidência mostrando que macrofases executam um papel principal na patogênese de HIV, agindo como reservatórios de disseminação de vírus através de todo o sistema imune (Gendelman e outros., 1989, AIDS 3:475-495;

30 Meltzer e outros., 1990; Ann. Rev. Immunol. 8:169-

194). Foi recentemente reportado que no estágio anterior da infecção, e através de todo o estágio clinicamente latente, o HIV se acumula e se duplica ativamente nos órgãos linfóides apesar de uma
05 atividade viral mínima no sangue periférico (Pantaleo e outros., 1993, Nature 362:355-358; Embretson e outros., 1993, Nature 362:359-362; Fox e outros., 1994, Nature 370:256). A alta carga viral observada nos tecidos linfóides foi reportada para
10 ser associada à partículas de HIV presas nas células dendríticas foliculares dos centros germinais. Durante o curso da infecção de HIV, a rede de células dendríticas foliculares foi gradualmente rompida e finalmente destruída. A medida que o
15 micro-ambiente de tecidos linfóides é crucial para resposta imune efetiva, é primordial reduzir-se ou anular-se o acúmulo de HIV nos tecidos linfóides de modo a preservar a integridade da rede de micro-ambiente. O uso de liposomas como um sistema de
20 distribuição da droga é particularmente relevante para controlar a progressão de doença de HIV. Desde que os liposomas são naturalmente acolhidos pelas células do sistema fagócito mononuclear (MPS), a terapia baseada em liposoma deve concentrar os
25 agentes antivirais dentro das células susceptíveis à infecção de HIV e, ao mesmo tempo, reduzir a quantidade de drogas nos locais onde ele deve ser potencialmente tóxico. As drogas encapsuladas de liposoma podem, portanto, representar uma estratégia
30 conveniente para reduzir a disseminação de HIV para

os tecidos linfóides, e preservar o micro-ambiente de células dendríticas foliculares que similarmente protegerão o hospedeiro infectado de desenvolver o estado imunodeficiente característico.

05 O uso de liposomas como sistema de distribuição de droga pode oferecer benefícios importantes quando comparado à droga de origem. Por exemplo, os liposomas podem proteger as

10 drogas contra degradação enzimática, aperfeiçoar suas farmacocinéticas e distribuição de tecido, e podem também permitir um desprendimento controlado de agentes terapêuticos para células apropriadas. Em

15 adição, a distribuição e disponibilidade terapêutica de liposomas podem ser moduladas através de variações de seu tamanho, lamellaridade, composição de lipídeo, carga e propriedades superficiais. E,

20 desse modo, primordial adaptar as propriedades físico-químicas de liposomas com o objetivo terapêutico desejado. É um objetivo da presente invenção gerar formulações liposomais de drogas para o tratamento de AIDS e outras doenças virais. Tal sistema de distribuição objetivado deve resultar

25 esperançosamente em uma eficácia aumentada e toxicidade reduzida de agentes antivirais em seres humanos que sofrem de AIDS ou outras doenças virais. Em adição, a biodisponibilidade de droga

30 aperfeiçoada após encapsulamento de drogas nos liposomas, pode reduzir o intervalo de dosagem, e, conseqüentemente, aperfeiçoar a qualidade de vida de pacientes infectados com HIV e outras viroses.

A invenção se refere a um processo para o tratamento de doenças virais, compreendendo a administração de agentes antivirais encapsulados em liposomas. A invenção também se refere a formulações de liposomas para o tratamento de doenças virais, e, mais particularmente, para o tratamento de infecções causadas por viroses similares à HIV e CMV. As formulações de liposomas são compostas de classes específicas de componentes de lipídeos, e contém uma droga presa efetiva contra a doença viral. A originalidade da presente invenção é que estas formulações liposomais de drogas permitem alta penetração celular em linhas de células diferentes, boa atividade antiviral in vitro contra HIV e CMV, eficiente objetivação in vivo de reservatórios de HIV, e um aperfeiçoamento marcado nas farmacocinéticas de drogas (ver Exemplos).

Em uma concretização preferida, formulações de liposomas são compostas de distearoilfosfatidilcolina (DSFC): distearoilfosfatidilglicerol (DSPG) em uma razão molar de 10:3, apresentam um diâmetro de partícula médio entre cerca de 0,05 e 0,5 μm , e contém 2'-3'-dideoxiinosina (ddI) como uma droga antiviral. Em outra concretização preferida, formulações de liposomas são compostas de DSFC : DSPG: distearoilfosfatidil-etanolamina-polietilenoglicol (DSPE-PEG) em uma razão molar de 10:3:1,45, apresentam um diâmetro de partícula médio entre cerca de 0,05 e 0,5 μm , e contém 2'-3'-

dideoxiinosina (ddI) como uma droga antiviral. Em outra concretização preferida, o polietilenoglicol apresenta um peso molecular entre cerca de 500 e 5000 daltons. Em outra concretização preferida, as

05 formulações de liposomas são compostas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) : dicetilfosfato (DP) : colesterol (CHOL) em uma razão molar de 4:1:5, apresentam um diâmetro de partícula médio entre cerca de 0,05 e 0,5 μm , e contém 2'-3'-

10 dideoxicitidina (ddC) como uma droga antiviral. Em ainda outra concretização preferida, as formulações de liposomas são compostas de DPPC : dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) em uma razão molar de 10:3, apresenta um diâmetro médio de

15 partícula entre cerca de 0,05 e 0,5 μm , e contém foscarnet como uma droga antiviral.

As Figuras 1a e 1b ilustram o acúmulo de ddI livre e liposomal (20 μM de ddI) como uma função do tempo, em células U937 (Figura 1a) e

20 células RAW 264.7 (Figura 1 b). As Figuras 1c e 1d ilustram o acúmulo de ddC livre e liposomal (25 μM de ddC) como uma função do tempo, em células U937 (Figura 1c) e células RAW 264.7 (Figura 1d). As Figuras 1e e 1f ilustram o acúmulo de ddC livre e

25 liposomal e foscarnet, respectivamente, como uma função da concentração de droga em células RAW 264.7.

As Figuras 2a, 2b e 2d mostram a atividade antiviral de ddI livre e liposomal (40

30 μM de ddI), ddC (0,01 μM de ddC) e foscarnet (1 μM

de foscarnet), respectivamente, em células U937 infectadas com HIV-1_{IIIB}. As Figuras 2c e 2e mostram a atividade antiviral de ddC livre e liposomal (0,01 μ M de ddC) e foscarnet (1 μ M de foscarnet),
05 respectivamente, em células Molt-4 clone-8 infectadas com HIV-1_{IIIB}. A Figura 2f mostra a atividade antiviral de foscarnet livre e liposomal (1 μ M) em células Supt-1 infectadas com HIV-1_{IIIB}. A Figura 2g mostra a inibição da expressão de proteína
10 CMV p72 em células de fibroblastos de pulmão humano (linha de célula MRC-5) por foscarnet livre e liposomal (PFA e L-PFA, respectivamente).

As Figuras 3a, 3b, 3c representam a distribuição de plasma e tecido de ddI livre (Figura 3a), ddI liposomal (Figura 3b) e lipídeo liposomal (Figura 3c) em ratos após a
15 administração de ddI livre ou ddI presos nos lipossomas compostos de DSPC : DSPG em uma razão molar de 10:3, e tendo um diâmetro de partícula médio de 0,175 μ m. As Figuras 3d e 3e representam a
20 distribuição de plasma e tecido de ddI liposomal (Figura 3d) e lipídeos lipossomais (Figura 3e) em ratos após a administração de ddI preso em lipossomas compostos de DSPC:DSPG:DSPE-PEG em uma razão molar
25 de 10:3:1,45, e tendo um diâmetro de partícula médio de 0,150 μ m. As Figuras 3f, 3g, 3h e 3i representam a distribuição de plasma e tecido de ddC livre e liposomal (ddC e L-ddC) em ratos, 1 hora (Figura 3f e 3h), e 3 horas (Figura 3g e 3i) após a
30 administração intravenosa (Figura 3f e 3g), ou

intraperitonal (Figura 3h e 3i) de ddC livre ou ddC preso em liposomas compostos de DPPC:DP:CHOL, em uma razão molar de 4:1:5, e tendo um diâmetro de partícula médio de 0,300 μ m. As Figuras 3j, 3k e 3l mostram a distribuição de plasma e tecido de foscarnet liposomal (Figura 3j), foscarnet livre (Figura 3k) e lipídeos liposomais (Figura 3l) em ratos após a administração de foscarnet livre ou foscarnet preso em liposomas compostos de DPPC:DPPG, em uma razão molar de 10:3, e tendo um diâmetro de partícula médio de 0,165 μ m. Nas Figuras 3a a 3l, os valores representam meios (\pm SEM) obtidos de 4 a 6 animais por grupo por ponto de tempo.

Componentes de lipídeo

Em produtos baseados em liposomas, é necessário usar-se bi-camadas características de liposoma que permitem alta eficiência de encapsulamento de droga, bem como vazamento reduzido de droga captada para levar vantagem da capacidade dos liposomas distribuírem alta quantidade de agentes antivirais em células infectadas. No caso das drogas sob o escopo desta invenção, estes requerimentos são obtidos pelo uso de liposomas compostos de i) uma mistura de diacilfosfatidilcolina e diacilfosfatidilglicerol (em uma razão molar variando entre 10:1 e 1:1), no qual as cadeias acil são, ou saturadas ou insaturadas, e têm entre 14 e 18 átomos de carbono em comprimento, ou ii) uma mistura de diacilfosfatidilcolina : dicetilfosfato : colesterol

em uma razão molar de 4:1:5, no qual as cadeias acil de fosfatidilcolina são, ou saturadas ou insaturadas, e têm entre 14 e 18 átomos de carbono de comprimento.

05 Os liposomas da presente invenção incluem liposomas estericamente estabilizados, definidos aqui como liposomas compostos dos componentes de lipídeos acima mencionados, e que são modificados pela incorporação
10 de polímeros, tais como poloxâmeros e poloxaminas, ou de lipídeos anfipáticos derivados com um polímero tal como DSPE-PEG, ou dioleoilfosfatidiletanolamina-PEG (DOPE-PEG). Detalhes para a síntese de DSPE-PEG são providos no Exemplo 1. Os liposomas da presente
15 invenção também incluem imunopolisomas, definidos aqui como liposomas ou liposomas estericamente estabilizados compostos dos componentes de lipídeos acima mencionados, e que são modificados pelo acoplamento de moléculas de anticorpos que aumentam
20 a objetivação das células específicas.

Nem todas as formulações liposomais testadas têm mostrado eficiente encapsulamento de droga e retenção de droga. Por exemplo, o prendimento de ddI em liposomas compostos
25 de egg fosfatidilcolina : colesterol em uma razão molar de 55:45, mostrou uma eficiência de encapsulamento de droga que foi de cerca de 30 vezes menor do que aquela observada para liposomas compostos de DSPC : DSPG em uma razão molar de 10:3.
30 Por outro lado, cerca de 90% de ddI foi desprendido

de vesículas multilamelares compostas de egg PC :
colesterol : cardiolipin em uma razão molar de
35:45:10 após somente 1 hora de incubação em soro
humano. Em contraste, somente 10% de dđI foi
05 desprendido a partir de vesículas multilamelares
compostas de DSPC : DSPG em uma razão molar de 10:3
em condições similares após 5 horas de incubação em
soro humano.

Mesmo embora os exemplos
10 seguintes descrevam formulações liposomais
específicas, é considerado que uma família de
formulações liposomais podem ser facilmente
derivadas a partir das mesmas, sem afetar as
propriedades valiosas destas. Portanto, esta família
15 de compostos compreende outras cadeias acil ou dadas
formulações de fosfolípidos que foram testadas na
prática.

Preparação de liposomas

Um grande número de técnicas
20 de preparação de liposomas têm sido desenvolvidas no
passar de poucos anos, em resposta ao número
crescente de aplicações específicas de liposomas
como sistema de distribuição de droga. A preparação
de liposomas na presente invenção pode ser feita por
25 uma variedade de técnicas, tais como aquelas
descritas na literatura (Szoka e Papahadjopoulos,
1980, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467-508;
Nassander e outros., 1990, Liposomas em polímeros .
Biodegradáveis como sistemas de distribuição de
30 droga. p. 261-338). Entre elas, a técnica de

hidratação de película de lipídeo delgada constitui um procedimento rápido e simples para gerar liposomas. Os liposomas gerados por esta técnica são na maioria das vezes vesículas multilamelares e
05 geralmente variam no tamanho de 0,2 a 10 μm . A técnica de hidratação de película de lipídeo delgada é detalhada no Exemplo 2. Outra técnica comum de preparação de liposomas é a técnica de evaporação de fase reversa descrita por Szoka e outros na Patente
10 dos Estados Unidos No 4.235.871. Os liposomas gerados por esta técnica são unilamelares ou plurilamelares, e geralmente variam no tamanho de 0,2 a 5 μm . A técnica de evaporação de fase reversa é detalhada no Exemplo 3.

15

Agentes antivirais

Qualquer inibidor de DNA viral e/ou síntese de RNA e/ou protease de HIV está sob o escopo desta invenção. Incluídos nesta classe estão agentes antivirais tais como 3'-azido-3'-
20 deoxitimidina (AZT), ddI, ddC, foscarnet, ribavirin, ganciclovir e saquinavir. A incorporação destas drogas nos liposomas pode ser efetuada por um ou mais processos de carregamento ativo e/ou passivo, tais como aqueles descritos na literatura (Mayer e
25 outros., 1986, Chem. Phys. Lipídeos 40:333-345).

As formulações de liposomas da presente invenção incluem aquelas tendo um diâmetro médio de partícula de qualquer tamanho, mas mais preferivelmente aquelas entre cerca de 0,05 e 0,5
30 μm . As formulações de liposomas da presente invenção

também incluem aquelas preparadas com qualquer razão molar de droga:lipídeo. Conforme anteriormente mencionado, a propensão dos lipossomas serem acolhidos pelas células do MPS deve concentrar os agentes antivirais presos dentro das células susceptíveis ao HIV ou outras infecções virais, aperfeiçoando, portanto, sua eficácia antiviral, e reduzindo sua toxicidade. Portanto, os exemplos seguintes são pretendidos para demonstrarem a preparação de formulações lipossomais específicas de drogas antivirais que podem ser muito eficientes para o tratamento de infecções por HIV e CMV, mas não são de nenhum modo pretendidos para limitar o escopo da mesma. Em adição, mesmo embora o efeito de formulações lipossomais de drogas tenha sido especificamente verificado em duas espécies virais, HIV e CMV, qualquer vírus sensível ao efeito de inibidores de DNA viral e/ou síntese de RNA e/ou protease de HIV está sob o escopo desta invenção.

EXEMPLO 1

Síntese de DSPE-PEG

Distearoilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol (DSPE-PEG) foi preparada conforme previamente descrito (Gabizon e Papahadjopoulos, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6949-6953; Klivanov e outros., 1990, FEBS Letters 266:235-237). Brevemente, metoxipolietilenoglicol succimidil succinato (PEG-OSu; MW 5000), DSPE e trietilamina em uma razão molar de 3:1:3,5 contendo 0,01 μ Ci de [14 C]-dioleoilfosfatidiletanolamina

DOPE [^{14}C]-DOPE por nmol de lipídeo foram incubados durante a noite à temperatura ambiente em CHCl_3 . O solvente foi em seguida evaporado sob uma corrente de nitrogênio, e a mistura seca resultante foi hidratada com água bi-destilada. A solução de miscelas foi filtrada através de uma coluna (32 x 2 cm), contendo Bio-Gel A-1,5 M (50-100 mesh), para remover PEG-OSu desacoplado. As frações de pico contendo DSPE-PEG foram determinadas por ambas contagens de cintilação (para [^{14}C]-DOPE-PEG) e leituras de absorvância em 225 nm (para PEG-OSu livre). As frações contendo DSPE-PEG foram associadas e dializadas por 24 horas contra água, usando-se membrana de diálise com um corte de peso molecular nominal (MWCO) de 300.000 (Spectra-Por, Spectrum Medical, Los Angeles, CA), e, em seguida, liofilizadas. O DSPE-PEG pode também ser obtido comercialmente em uma variedade de pesos moleculares.

EXEMPLO 2

2'-3'-dideoxiinosina (ddI) foi encapsulada em liposomas compostos de DSPC:DSPE em uma razão molar de 10:3, e DSPC:DSPE-PEG em uma razão molar de 10:3:1,45, usando-se a hidratação de película de lipídio delgada. O DSPE-PEG pode ser sintetizado de acordo com o Exemplo 1, ou obtido comercialmente. Em breve, a mistura de lipídeo foi dissolvida em clorofôrmio : metanol (2:1 v/v na presença de uma pequena proporção de [^{14}C]-DPPC (<0,002% mol/mol), e solvente foi em seguida

evaporado em um frasco de fundo redondo para formar uma película de lipídio delgada na parede do frasco. A película de lipídeo foi em seguida hidratada com uma solução amortecida de fosfato (PBS, 145 mM, pH 7,4) de ddi em uma razão molar de droga/lipídeo de 2, na qual uma pequena proporção de ddi radio-rotulado [^3H] foi adicionada. Após aproximadamente uns 30 minutos mantidas à temperatura ambiente, as vesículas multilamelares (MLVs) foram formadas após agitação mecânica da preparação liposomal à uma temperatura acima do gel para transição de fase de fluido da mistura de lipídeo. As MLVs foram extrudadas com um dispositivo de extrusão de aço inoxidável (Lipex Biomembrana, Vancouver, BC) através de membranas de polycarbonato (Nuclepore, Cambridge, MA) de 0,2 μm . A distribuição de tamanho da vesícula e homogeneidade foram avaliadas pelo dispersor de luz quase elástico (QELS) com um analisador de partícula de sub-micron (modelo N4SD Coulter Electronics, Hialeath, FL). O diâmetro médio dos liposomas extrudados foi $0,175 \pm 0,035 \mu\text{m}$, e $0,15 \pm 0,01 \mu\text{m}$ para as formulações de DSPC : DSPG, e formulações de DSPC : DSPE-PEG, respectivamente. A droga não-encapsulada foi removida, ou por centrifugação (300g para 15 minutos à 40C) da preparação liposomal (1 ml) através de uma coluna de grossos de 10 ml Sephadex G-50 (Pharmacia LKB, Montreal, QC), ultracentrifugação (160000g para 90 minutos à 40C), ou por diálise contra um volume determinado de PBS. A eficiência de prendimento da

05

2'-3'-dideoxycitidina (ddC)

foi encapsulada em liposomas compostos de DPPC : DP
: CHOL em uma razão molar de 4:1:5, usando-se o
processo de evaporação de fase reversa (Szoka e
Papahadjopoulos, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA
10 75:4194-4198). Em breve, a mistura de lipídeo foi
dissolvida em clorofórmio : metanol (2:1 v/v), na
presença de uma pequena proporção de colesterol [1-
14C] oleato, e solvente foi em seguida evaporado em
um frasco de fundo redondo para formar uma película
15 de lipídeo delgada na parede do frasco. A película
de lipídeo foi em seguida re-dissolvida em
isopropiléter : metanol (3:0,8 v/v). A esta fase
orgânica foi adicionada uma solução amortecida de
fosfato (PBS, 145 mM, pH 7,4) de ddC em uma razão
20 molar de droga/lipídeo de 3,6, contendo uma pequena
proporção de [³H]-ddC radio-rotulado. A mistura das
duas fases foi em seguida exposta a ultra-som por 5
minutos em um banho ultra-sônico à temperatura
ambiente para dar uma solução homogênea. O solvente
25 orgânico foi eliminado sob vácuo em condições
controladas por retro-evaporação a 50°C. As
suspensões de liposomas foram em seguida extrudadas
através de membranas de polycarbonato de 0,4 µm. A
distribuição de tamanho das vesículas e
30 homogeneidade foram avaliadas pelo QLS. O diâmetro

médio dos liposomas extrudados foi $0,300 \pm 0,08 \mu\text{m}$. A droga não-encapsulada foi removida conforme descrito acima, e a eficiência de encapsulamento de ddC foi estimada por contagens de radioatividade.

05

EXEMPLO 4

Foscarnet foi encapsulado em liposomas usando-se o processo de evaporação de fase reversa, conforme descrito para a preparação liposomal de ddC (Exemplo 3), exceto que o
10 componente de lipídeo foi DPPC : DPPG, em uma razão molar de 10:3. Neste caso, a razão molar de droga/lipídeo foi de 5, e os [^3H]-DPPC e [^{14}C]-foscarnet foram usados como marcadores de droga e lipídeo, respectivamente. As suspensões de liposomas
15 foram extrudadas através de membranas de polycarbonato de $0,2 \mu\text{m}$, gerando liposomas com um diâmetro médio de $0,165 \pm 0,030 \mu\text{m}$. A droga não-encapsulada foi removida conforme descrito acima, e a eficiência de encapsulamento de foscarnet foi
20 estimada por contagens de radio-atividade.

Exemplos comparando drogas liposomais com drogas livres

Levantamento celular

Nós temos realizado
25 experimentos in vitro para avaliar o acúmulo de agentes anti-HIV encapsulados com liposoma e livres em células murina monócito-macrofase RAW 264.7, e em células premonocitóides U937 humanas. Em breve, experimentos foram realizados por incubação de
30 células confluentes em meio de cultura na presença

de concentrações diferentes de agentes anti-HIV encapsulados de liposoma e livres, no qual uma pequena proporção de drogas radio-rotuladas e lipídeos foi adicionada. Em diferentes tempos de incubação, o meio foi removido e as células foram lavadas e tratadas com uma solução de Triton X-100. A droga e lipídeo foram determinadas pela medição do nível de radio-atividade com um contador de cintilação de líquido. A concentração de proteína para cada amostra foi determinada com um ensaio de proteína de ácido bicinconínico Pierce (Rockford, IL) em placas de micro-título. Os resultados mostram que a incorporação de ddC em liposomas aumenta grandemente a ascendência de droga em ambas as células RAW 264.7 e U937 (Figuras 1c, 1d e 1e). Similarmente, o foscarnet liposomal acumula muito melhor do que a droga livre nas células RAW 264.7 (Figura 1f). Em contraste, embora o nível de ascendência de ddI liposomal nestas células foi similar àquele de formulações de liposoma de ddC ou foscarnet, um acúmulo mais alto de ddI livre foi observado em ambas as linhas de células (Figuras 1a e 1b), sugerindo-se uma permeabilidade de membrana maior destas linhas de células para ddI comparada aos outros agentes anti-HIV.

Eficácia antiviral in vitro

A eficácia antiviral das formulações liposomais de drogas antivirais foi também avaliada em linhas de células diferentes. Brevemente, as células foram infectadas com tipos

diferentes de HIV com uma multiplicidade de infecção de 1 (virus/célula alvo), e foram tratadas com concentrações diferentes de drogas encapsuladas de liposomas e livres. A duplicação do virus foi monitorada em intervalos de tempo diferentes pela medição, ou da atividade de transcriptase reversa em sobre-nadantes de célula livre, ou pela proteína p24 viral, usando-se um teste enzimático. A transcrição do virus foi também monitorada pela análise de reação de cadeia de polimerase (PCR) 24 horas após tratamento, usando-se um par principal de HIV (M661/M667). A avaliação do PCR foi normalizada em relação à quantidade de gene de beta-globin humano em células. A viabilidade da célula foi avaliada usando-se um ensaio colorimétrico baseado em tetrazólium (MTT). Os resultados mostraram que a incorporação de ddC nos liposomas tem resultado em eficácia anti-HIV comparável, ou mesmo melhor do que o agente livre contra duplicação HIV-1_{IIIB} em células U937 e Molt-4 clone-8 (Figuras 2b e 2c). Similarmente, o foscarnet liposomal mostrou eficácia antiviral comparável ou mesmo melhor do que aquela da droga não-encapsulada contra duplicação HIV-1_{IIIB} em células U937, Molt-4 clone-8 e Supt-1 (Figuras 2d, 2e e 2f). Embora a eficácia antiviral da formulação liposomal de ddI fosse menor do que aquela do agente livre contra duplicação HIV-1_{IIIB} nas células U937 (Figura 2a), uma eficácia de anti-HIV maior foi observada para ddI liposomal contra duplicação de HIV-1_{Ada-M} em microfases derivadas de

monócito (Tabela 1). É apreciado que, como os liposomas são preferencialmente captados pelas células do MPS, a eficácia de anti-HIV muito mais alta das drogas liposomais sobre as drogas livres, será similarmente observada sob situações in vivo.

Tabela 1: Eficácia antiviral de ddI livre e liposomal em macrofases derivadas de monócito primário infectadas com HIV-1_{Ada}^a.

	Tratamento	Concentração (μ M)	p24 (ng/ml)
10			7
	Não-tratado	0	161
	ddI	0,1	0
	Liposomal	1	0
		10	0
15	ddI livre	0,1	0
		1	0
		10	0
	Dias pós-infecção		
	13	17	
20	1,263	7.700	
	0	0	
	0	0	
	0	0	
	20	280	
25	0	0	
	0	0	

^aCélulas mononucleares de sangue periférico foram suspensas em meio de semeadura em uma placa de poço 48 à uma densidade de 3×10^6 células/ml. Cinco dias após iniciação da

cultura, as células não-aderentes foram removidas pela lavagem das culturas quatro vezes com PBS. As células aderentes foram primeiro pré-incubadas na presença ou ausência de meio contendo droga por 2 horas antes da inoculação com 10.000 cpm/poço do tipo monocitotrópico Ada-M de HIV-1. Em seguida, o meio foi mudado de 4 a 5 dias, e foi substituído com meio suplementado ou não com ddI. A duplicação de vírus foi monitorada pela medição de níveis p24 usando-se um ensaio enzimático.

A atividade anti-CMV de foscarnet livre e encapsulado com liposoma foi também avaliada em células de fibroblastos de pulmão embrionário (linha de células MRC-5). Em breve, as células foram infectadas com o tipo AD169 de CMV humano, e foram tratadas com diluições de série de foscarnet livre e liposomal. Após umas 96 horas de incubação, as células foram fixadas e coloração de imunoperoxidase foi realizada usando-se um anticorpo monoclonal direcionado contra um kDa imediato anterior à proteína CMV. As placas rotuladas foram contadas e os resultados foram expressos como percentagem de células de controle infectadas não-tratadas versus concentração de foscarnet. Os resultados mostraram que foscarnet livre e liposomal apresentam atividade inibitória comparável contra a expressão de proteína CVM p72 em linha de célula MRC-5 (Figura 2g).

Estudos in vivo

30

As

propriedades

farmacocinéticas e distribuição de tecido dos agentes anti-HIV livres e encapsulados de liposomas foram investigados em ratos. Em breve, as drogas livres e encapsuladas de liposomas foram injetadas em ratos Sprague-Dawley fêmeas como uma dose intravenosa única, via um cateter inserido através da veia jugular dos animais. Em pontos de tempos específicos, os animais foram sacrificados e sangue foi coletado em tubos heparinizados, e separados por centrifugação. Ao mesmo tempo, os tecidos selecionados foram removidos, lavados, pesados e homogeneizados. Os tecidos e plasma foram em seguida tratados de acordo com um procedimento com solubilizador de tecido comercial. A determinação de níveis de droga e lipídeo em todas as amostras foram monitoradas com traçadores radio-ativos.

Os resultados mostraram claramente que o encapsulamento dos agentes antivirais nos liposomas resultaram em um acúmulo de droga muito maior em tecidos rico em micro-fases em relação àqueles observados para drogas não-encapsuladas (Figuras 3a a 3l). A distribuição de uma quantidade maior de agentes antivirais nestes tecidos susceptíveis à infecção de HIV, e a distribuição reduzida de drogas em locais onde ele deve ser potencialmente tóxico, deve resultar em uma eficácia diminuída e toxicidade reduzida dos agentes anti-HIV. De interesse particular, nós mostramos que o acúmulo de foscarnet liposomal nos nodos de linfa foi 8 vezes maior do que o agente

livre (Tabela 2; mesma formulação como nas Figuras 3j, 3k e 3l: 10 mg de foscarnet/kg).

05 Tabela 2: Área sob a curva de foscarnet livre e encapsulado de liposoma em tecidos diferentes, seguinte à administração de uma dose intravenosa única (10 mg de foscarnet/kg) em ratos.^a

	Tecidos	Foscarnet liposomal	Foscarnet livre
	Nodos de		
	linfa	163,5	20,3
10	Cérebro	40,8	3,1
	Olhos	86,9	22,9
	Baço	1151,4	0,8
	Fígado	62,5	1,2
	Pulmões	59,7	1,5
15	Tecidos	Razão L-foscarnet/foscarnet livre	
	Nodos de		
	linfa	8,1	
	Cérebro	13,2	
	Olhos	3,8	
20	Baço	1495,3	
	Fígado	52,1	
	Pulmões	39,8	

25 ^aValores, expressos em nmol foscarnet/g tecido/h, foram calculados a partir de valores médios do perfil de distribuição de tecido usando a regra trapezoidal.

30 Um acúmulo de droga aumentado foi também observado no cérebro de animais quando foscarnet liposomal preferivelmente do que o agente livre foi injetado em animais. Tal característica é

de grande importância, a medida que doenças severas do sistema nervoso central são envolvidas em patologia de HIV. Em adição, como nossos dados demonstram um aumento no acúmulo de droga nos olhos após a injeção de foscarnet liposomal preferivelmente do que a droga livre, a administração de foscarnet encapsulado em liposoma deve aperfeiçoar a eficácia da droga contra CMV em pacientes infectados com HIV, e tratados para retinites de CMV. As farmacocinéticas aperfeiçoadas também foram observadas após prendimento dos agentes antivirais nos liposomas (Tabelas 3 e 4; mesmas formulações como nas Figuras 3a a 3c, e 3j a 3l). A liberação sistêmica das drogas presas foi verificada ser muito menor do que aquela dos agentes livres, resultando em um grande aumento na meia-vida de eliminação das drogas liposomais. A farmacologia aperfeiçoada dos agentes antivirais após encapsulamento em liposomas deve esperançosamente diminuir a dose dos agentes antivirais usadas na terapia convencional, bem como a frequência de administração dos agentes anti-HIV, aperfeiçoando, portanto, a qualidade de vida de pacientes com AIDS e outras doenças virais.

Tabela 3: Parâmetros farmacocinéticos de ddI livre e liposomal seguinte à administração de uma dose intravenosa única (3 mg de ddI/kg) em ratos.^a

Parâmetros	<u>Liposomas estericamente estabilizados</u>
------------	--

DSPC:DEPG:PEG (10:3:1,45)		
	[³ H]ddI	[¹⁴ C]DPPC
t _{1/2} (h)	3,53	14,50
AUC _{0-∞}	950,3	17420
(nmol/ml/h)		
K _{el} (h ⁻¹)	0,20	0,048
Vd _{ss} (l/kg)	0,071	0,077
Cl (l/h/kg)	0,013	0,004
MRT (h)	5,31	21,04
10	<u>Liposoma convencional</u>	<u>ddI livre</u>
	DSPC:DEPG (10:3)	[³ H]ddI
	2,64 3,92	0,14
	649,9 4971	5,31
	0,26 0,18	4,97
15	0,074 0,070	0,48
	0,020 0,013	2,39
	3,79 5,51	0,20

^aParâmetros foram calculados a partir de curvas tempo-concentração de plasma usando-se um modelo não-compartimental. Abreviações: t_{1/2}, meia-vida de eliminação; AUC_{0-∞}, área sob a curva de tempo-concentração de plasma de zero a infinito; K_{el}, constante de taxa de eliminação; Vd_{ss}, volume de estado constante de distribuição; Cl, liberação sistêmica; MRT, tempo de residência médio.

Tabela 4: Parâmetros farmacocinéticos de PFA livre e encapsulado em liposoma seguinte à administração de uma dose intravenosa única (10 mg/kg) em ratos.^a

Parâmetros	Foscarnet livre	Foscarnet
farmacocinéticos	[¹⁴ C]-PFA	liposomal
t _{1/2} (h)	0,71 ± 0,04	3,06 ± 0,34
AUC _{0-∞}	48,0 ± 9,6	3687,5 ± 374,2
05 (nmol/ml/h)		
K _{el} (h ⁻¹)	0,96 ± 0,06	0,24 ± 0,03
Vd _{ss} (l/kg)	0,80 ± 0,14	0,040 ± 0,004
Cl (l/h/kg)	0,77 ± 0,15	0,010 ± 0,001
MRT (h)	1,04 ± 0,07	4,52 ± 0,42
10	Lipídio liposomal	
	[³ H]-DPPC	
	5,44 ± 0,79	
	24277,8 ± 2962,8	
	0,12 ± 0,02	
15	0,050 ± 0,003	
	0,006 ± 0,001	
	7,93 ± 1,12	

^aOs valores são expressos como médios ± SD obtidos de 6 animais por grupo por ponto de tempo. Abreviações: t_{1/2}, meia-vida de eliminação; AUC_{0-∞}, área sob a curva de tempo-concentração de plasma de zero a infinito; K_{el}, constante de taxa de eliminação; Vd_{ss}, volume de estado constante de distribuição; Cl, liberação sistêmica; MRT, tempo de residência médio.

REIVINDICAÇÕES

1- Formulação de liposomas para o tratamento de uma doença viral, caracterizada pelo fato de compreender: i) um componente lipídico compreendendo uma mistura de diacilfosfatidilcolina e diacilfosfatidilglicerol em uma razão molar variando entre 10:1 e 1:1, no qual as cadeias acil são ou saturadas ou insaturadas, e apresentam entre 14 e 18 átomos de carbono em comprimento; e ii) uma quantidade terapêutica de uma droga presa efetiva contra referida doença viral.

2- Formulação, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que referido componente de lipídeo compreende adicionalmente um derivado de polietilenoglicol de uma diacilfosfatidiletanolamina.

3- Formulação de liposomas para o tratamento de uma doença viral, caracterizada pelo fato de compreender: i) um componente de lipídeo compreendendo uma mistura de diacilfosfatidilcolina:dicetilfosfato:colesterol, em uma razão molar de 4:1:5, no qual as cadeias acil são ou saturadas ou insaturadas, e apresentam entre 14 e 18 átomos de carbono em comprimento; e ii) uma

quantidade terapêutica de uma droga presa efetiva contra referida doença viral.

05 4- Formulação, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que referido componente de lipídeo compreende adicionalmente um derivado de polietilenoglicol de uma diacilfosfatidiletanolamina.

10 5- Formulação de liposomas, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a droga presa é selecionada a partir do grupo consistindo de 3'-azido-3'-deoxitimidina (AZT), ddI, ddC, foscarnet, ribavirin, ganciclovir e saquinavir.

15 6- Formulação de liposomas, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que o componente de lipídeo é diacilfosfatidilcolina:diacilfosfatidilglicerol em uma razão molar de 10:3.

20 7- Formulação de liposomas, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que a droga presa é selecionada a partir do grupo consistindo de 3'-azido-3'-deoxitimidina (AZT), ddI, ddC, foscarnet, ribavirin, ganciclovir e sequinavir.

25 8- Formulação de liposomas, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que o componente de lipídeo é diacilfosfatidilcolina : diacilfosfatidilglicerol: diacilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol, em
30 uma razão molar de 10:3:1:1,45.

9- Formulação de liposomas, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que a droga presa é selecionada a partir do grupo consistindo de 3'-azido-3'-deoxitimidina (AZT), ddI, ddC, foscarnet, ribavirin, ganciclovir e saquinavir.

10- Formulação de liposomas, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que a droga presa é selecionada a partir do grupo consistindo de 3'-azido-3'-deoxitimidina (AZT), ddI, ddC, foscarnet, ribavirin, ganciclovir e saquinavir.

11- Formulação de liposomas, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2, 4, 8 e 10, caracterizada pelo fato de que o polietilenoglicol apresenta um peso molecular compreendido entre cerca de 500 e 5000 daltons.

12- Formulação de liposomas, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que o componente de lipídeo é distearoilfosfatidilcolina : distearoilfosfatidilglicerol em uma razão molar de 10:3, e a droga presa é 2'-3'-dideoxiinosina.

13- Formulação de liposomas, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que o componente de lipídeo é distearoilfosfatidilcolina : distearoilfosfatidilglicerol : distearoilfosfatidiletanolamina - polietilenoglicol em uma razão molar de 10:3:1,45, e a droga presa é

2'-3'-dideoxiinosina.

14- Formulação de liposomas,
de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo
fato de que o componente de lipídeo é
05 dipalmitoilfosfatidilglicerol em uma razão molar de
10:3, e a droga presa é foscarnet.

15- Formulação de liposomas,
de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo
fato de que o componente de lipídeo é
10 dipalmitoilfosfatidilcolina : dicetilfosfato :
colesterol em uma razão molar de 4:1:5, e a droga
presa é 2'-3'-dideoxiinosina.

16- Formulação de liposomas,
de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10
15 e 12 a 15, caracterizada pelo fato de que apresenta
um tamanho médio de partícula entre cerca de 0,05 e
0,5 μm .

17- Formulação de liposomas,
de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo
20 fato de apresentar um tamanho médio de partícula
compreendido entre cerca de 0,05 e 0,5 μm .

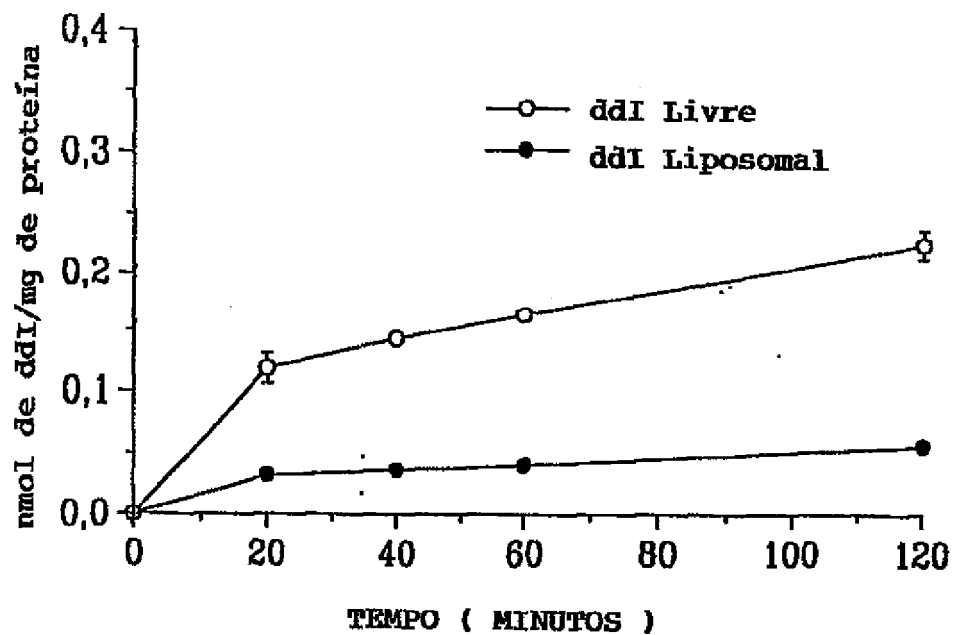
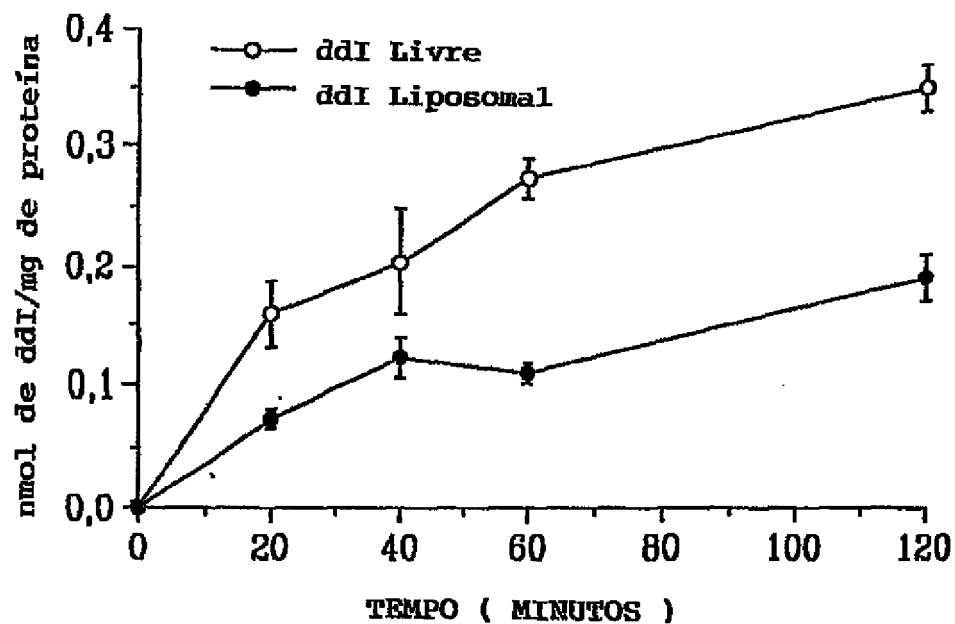
18- Processo para o tratamento
de uma doença viral em uma pessoa atingida,
caracterizado pelo fato de compreender, desse modo,
25 a etapa de administrar a formulação de liposomas de
acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10,
12 a 15, e 17 à referida pessoa.

19- Processo para o tratamento
de uma doença viral em uma pessoa atingida,
30 caracterizado pelo fato de compreender, desse modo,

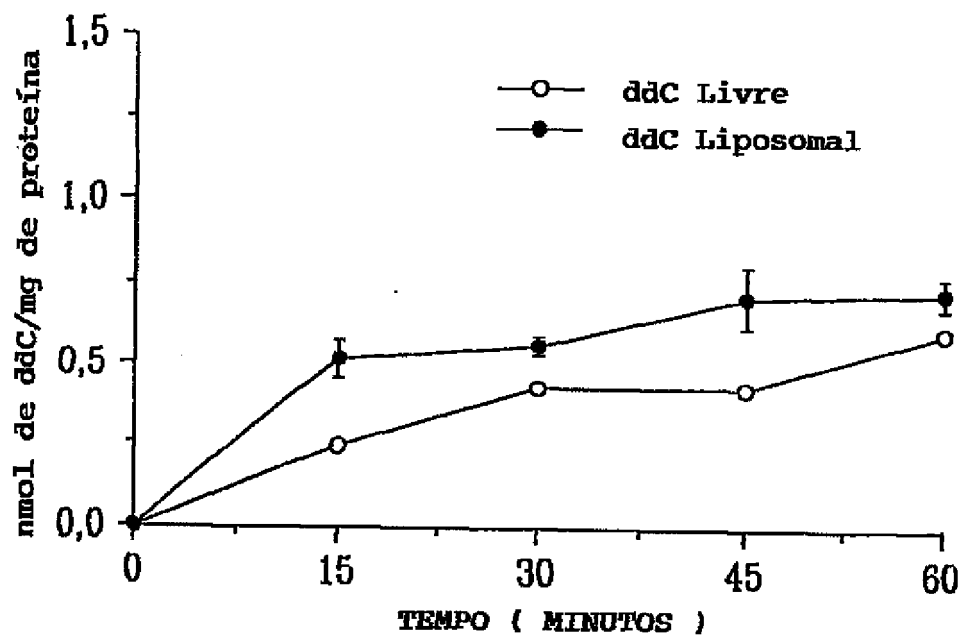
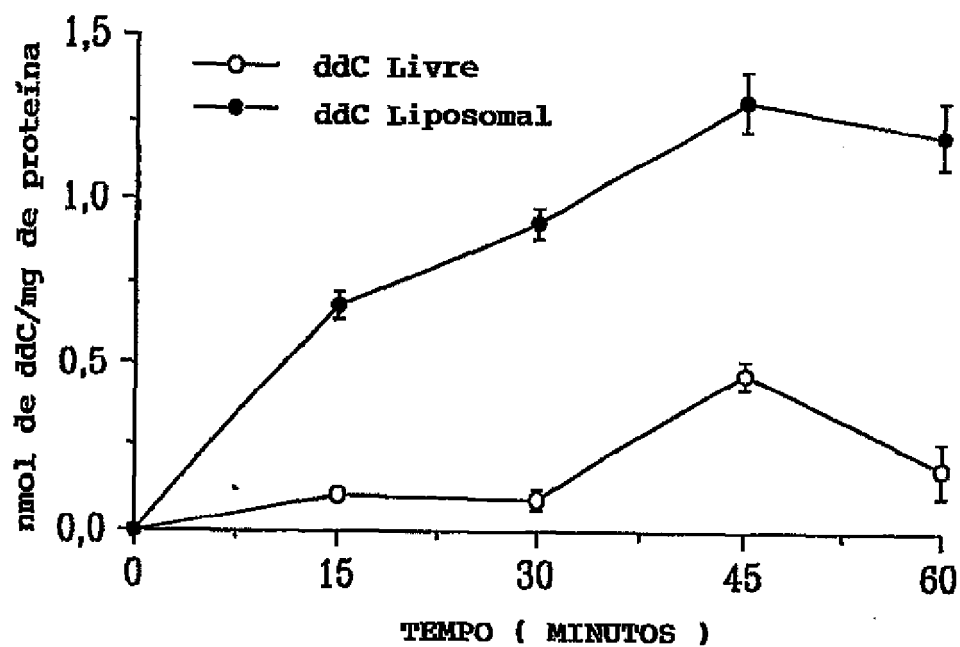
a etapa de administrar uma formulação de liposomas de acordo com a reivindicação 11 à referida pessoa.

05 20- Processo para o tratamento de uma doença viral em uma pessoa atingida, caracterizado pelo fato de compreender, desse modo, a etapa de administrar uma formulação de liposomas de acordo com a reivindicação 16 à referida pessoa.

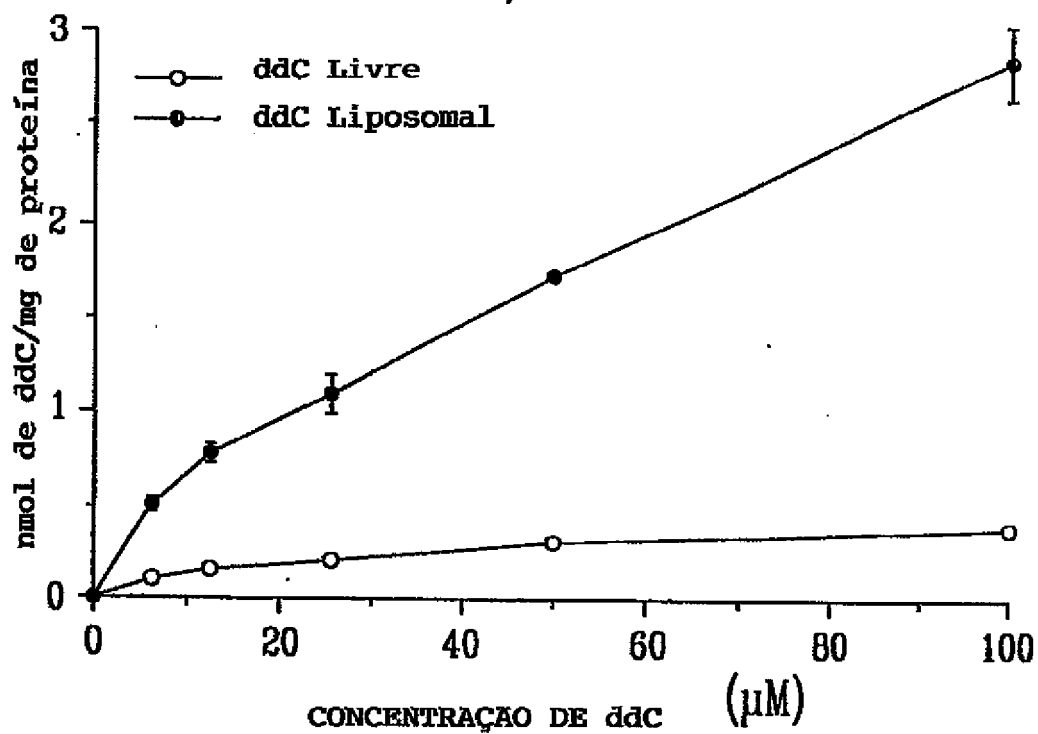
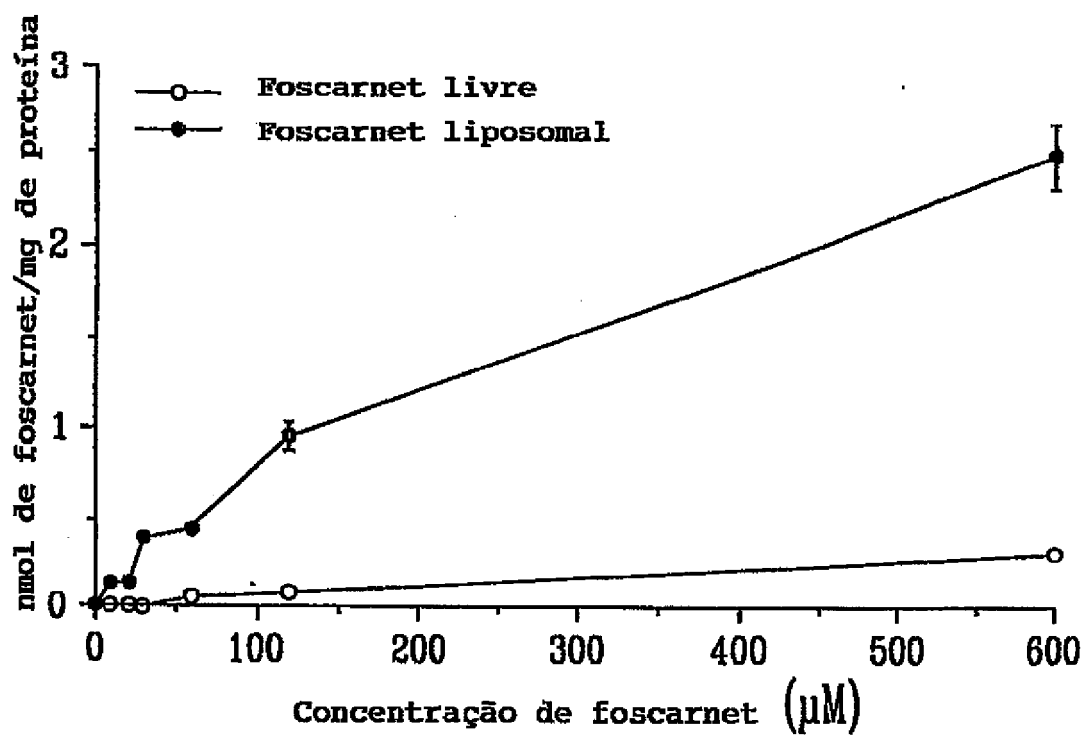
1/11

FIGURA 1AFIGURA 1B

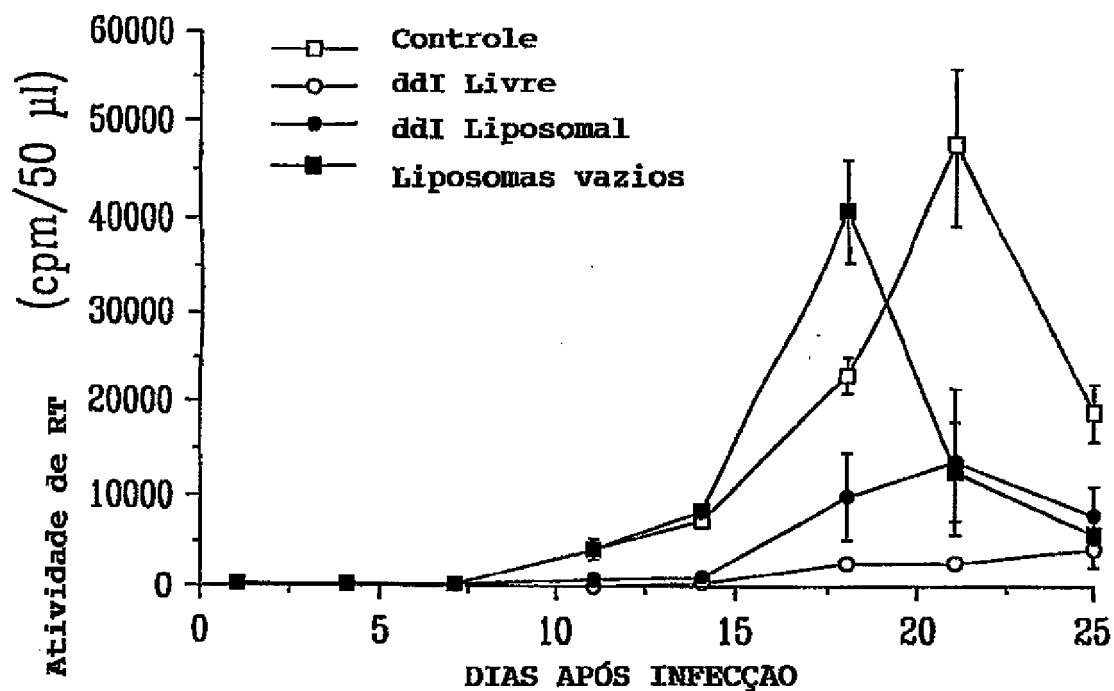
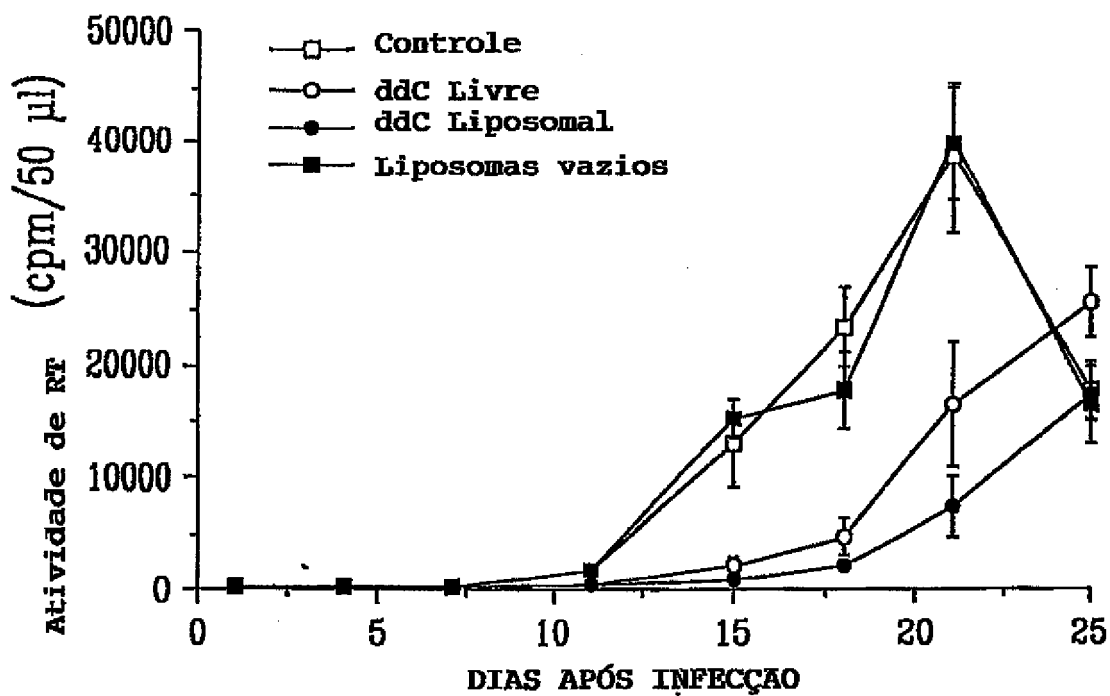
2/11

FIG. 11FIG. 10

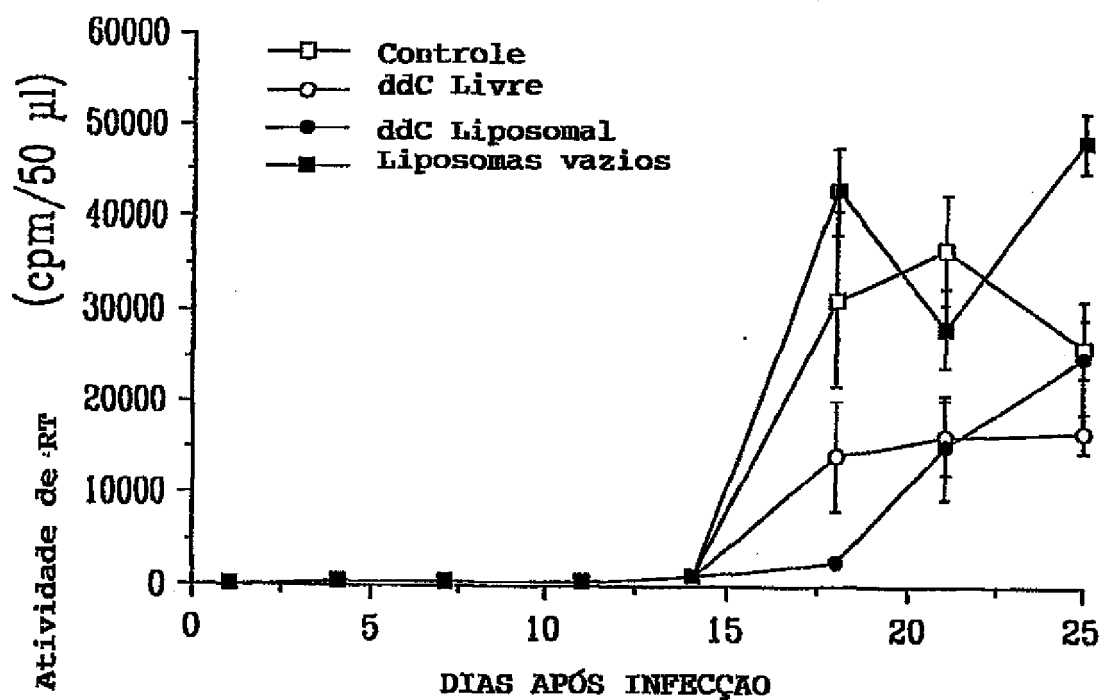
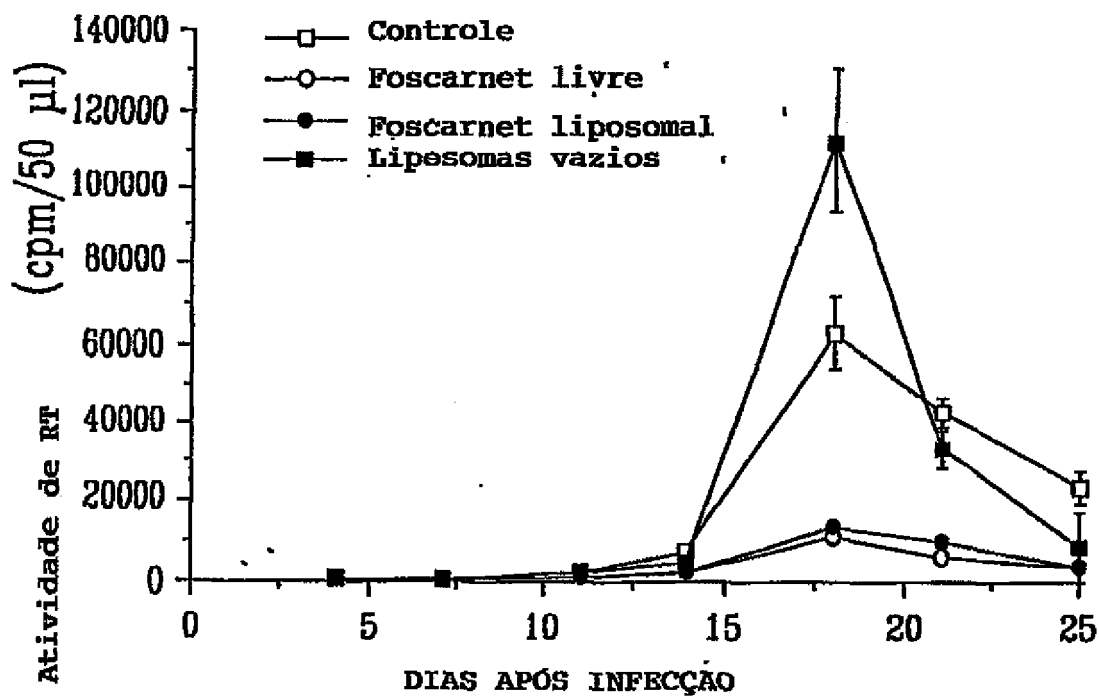
3/11

Fig. 1EFig. 1F

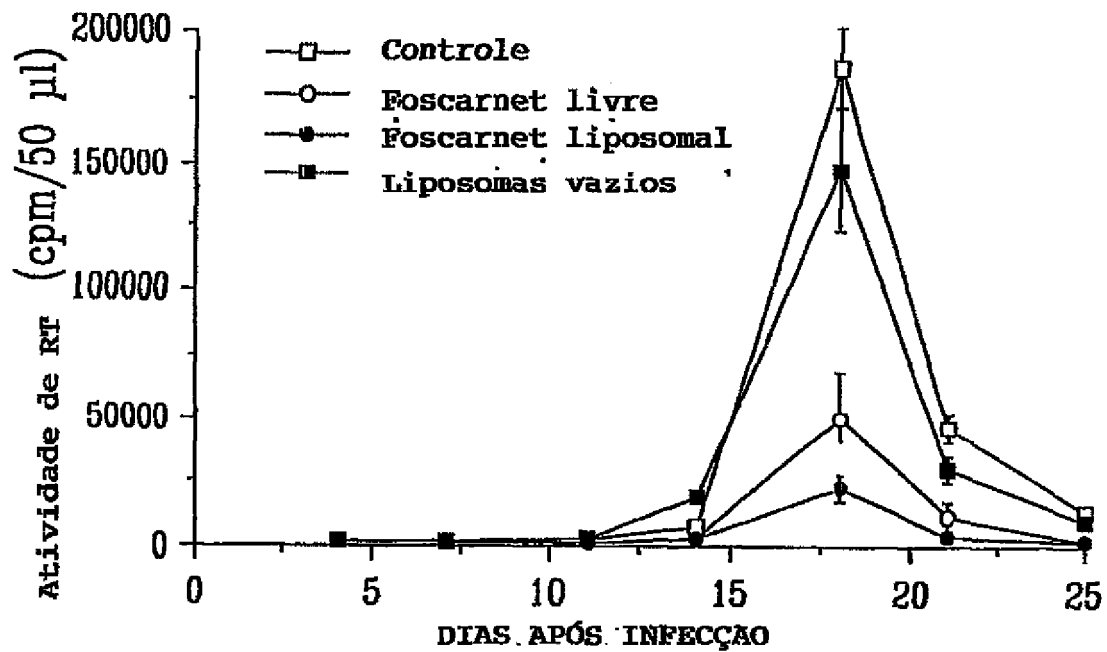
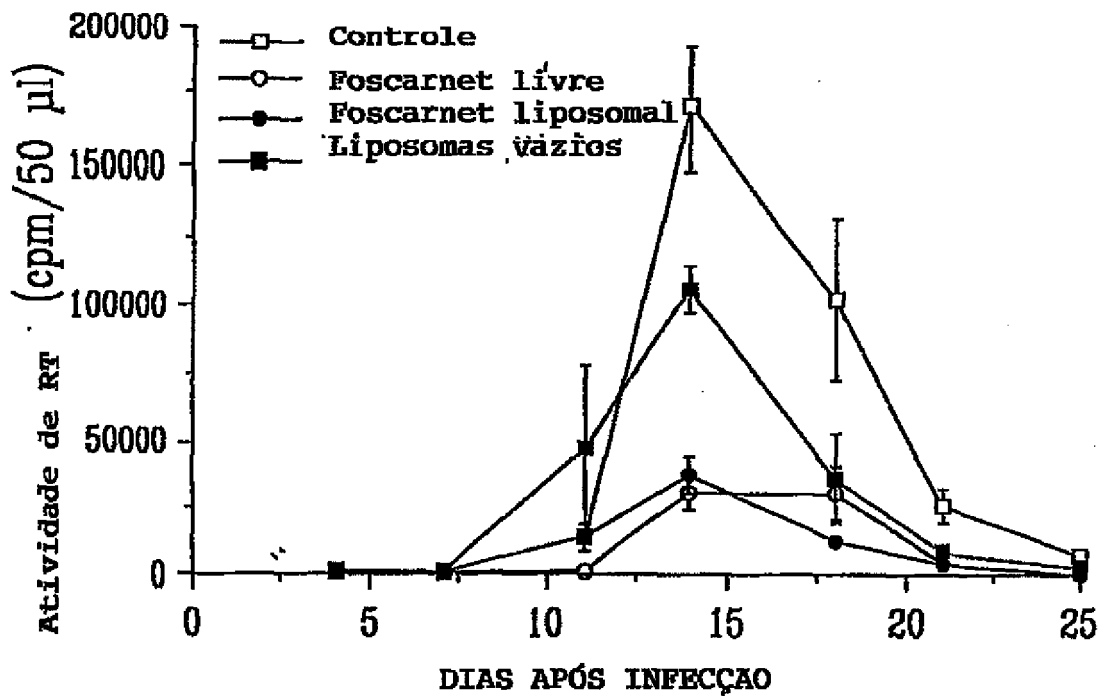
4/11

Fig. 2AFig. 2B

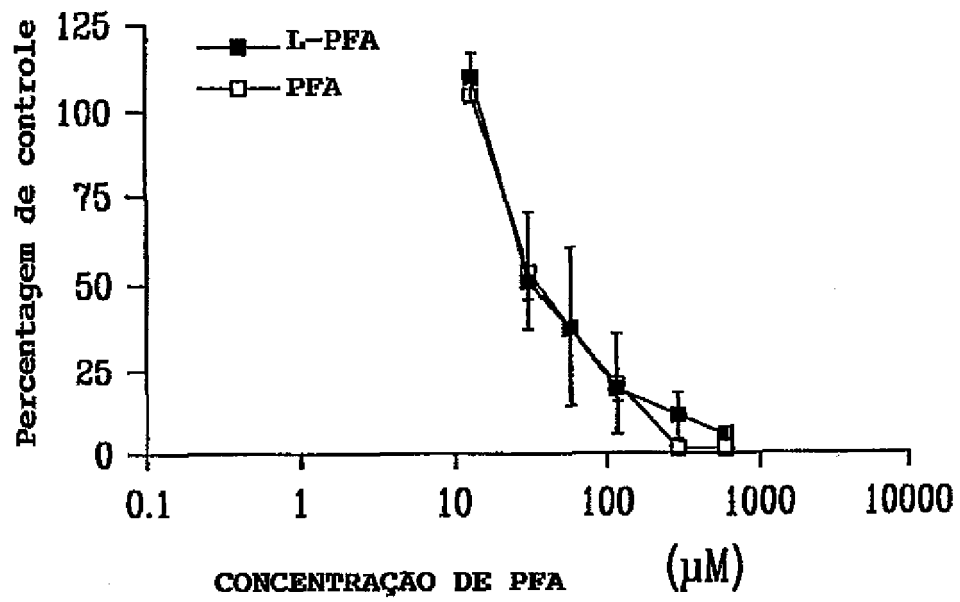
5/11

Fig. 2CFig. 2D

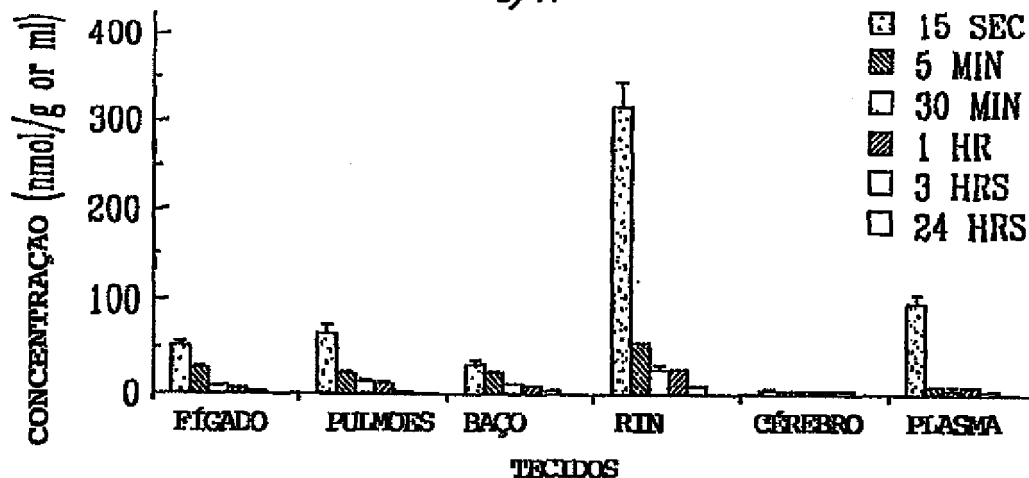
6/11

Fig. 2EFig. 2F

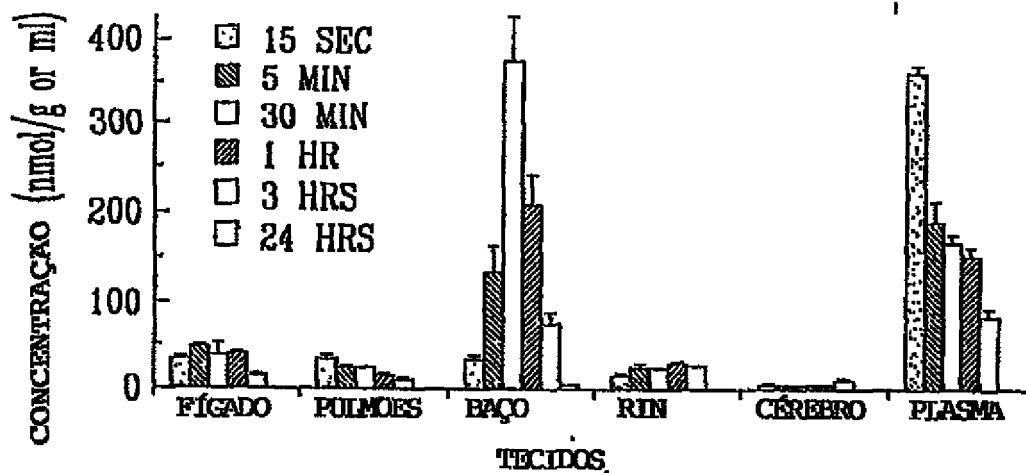
7/11

Fig. 26

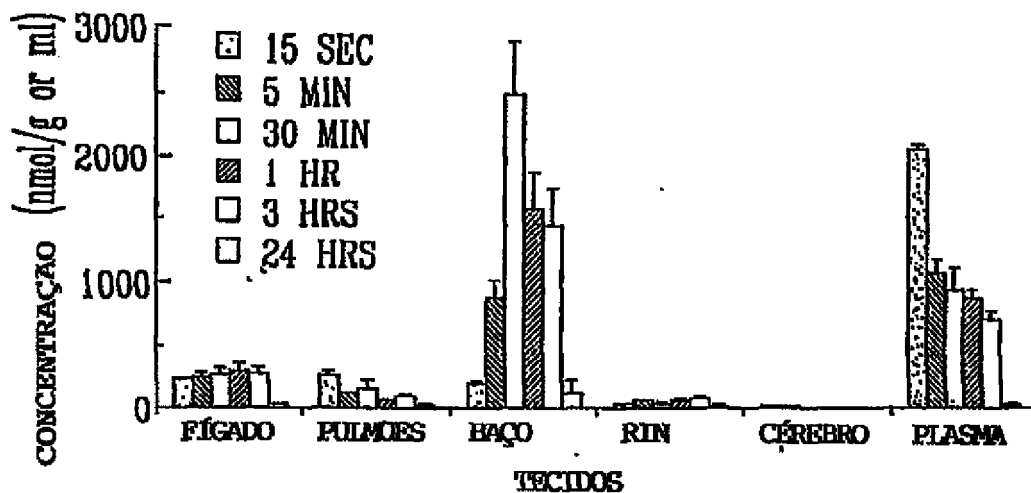
8/11



F x E - 3A

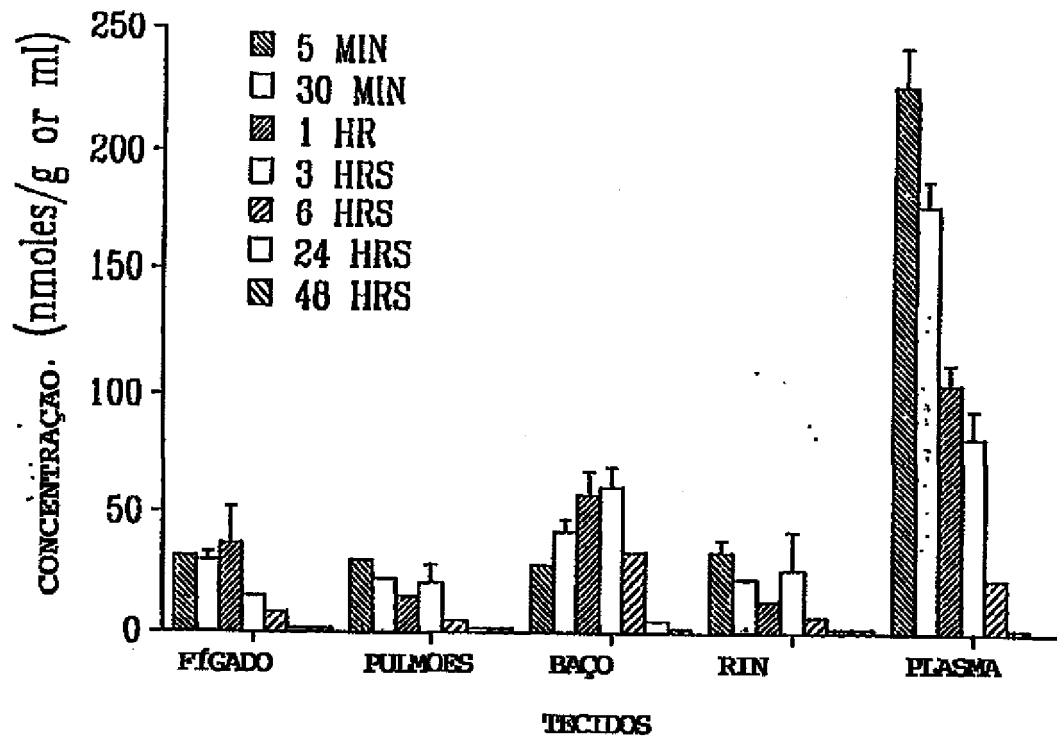


F x E - 3B

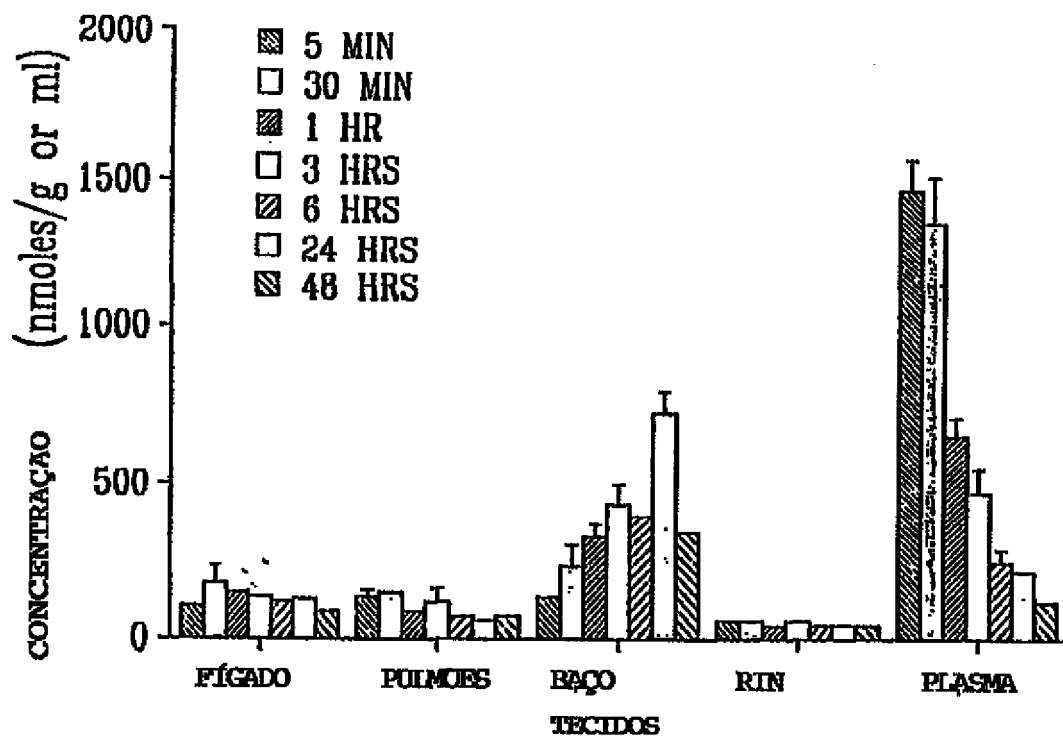


F x E - 3C

9/11

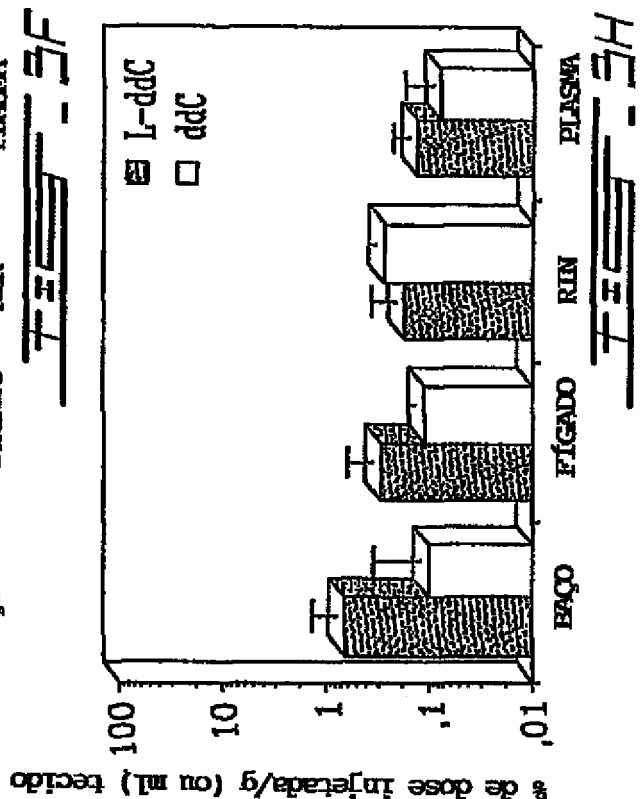
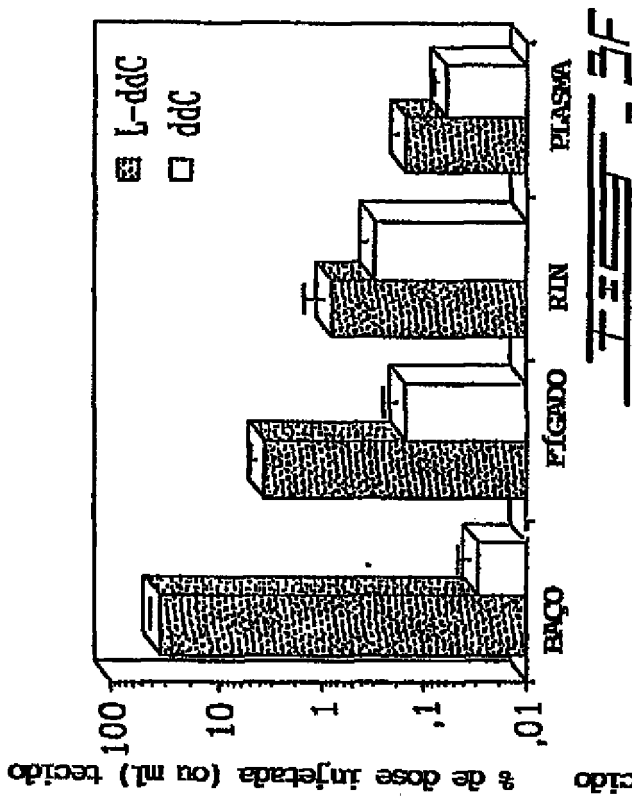
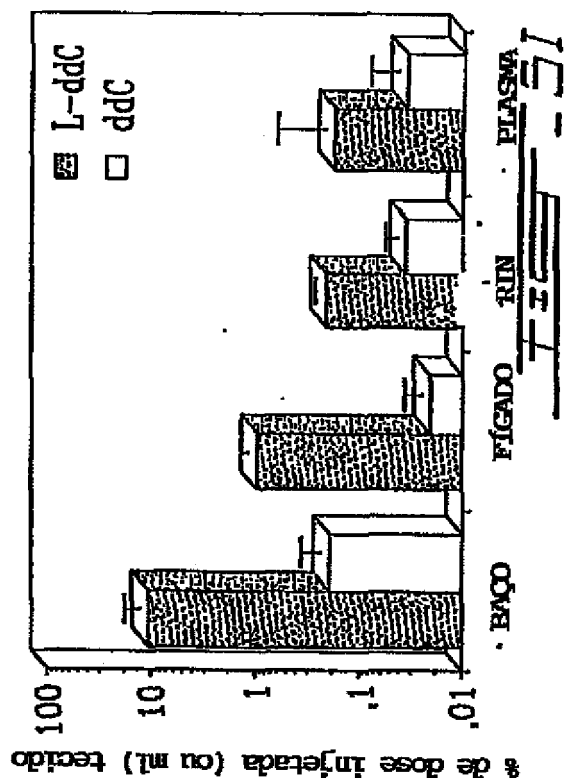
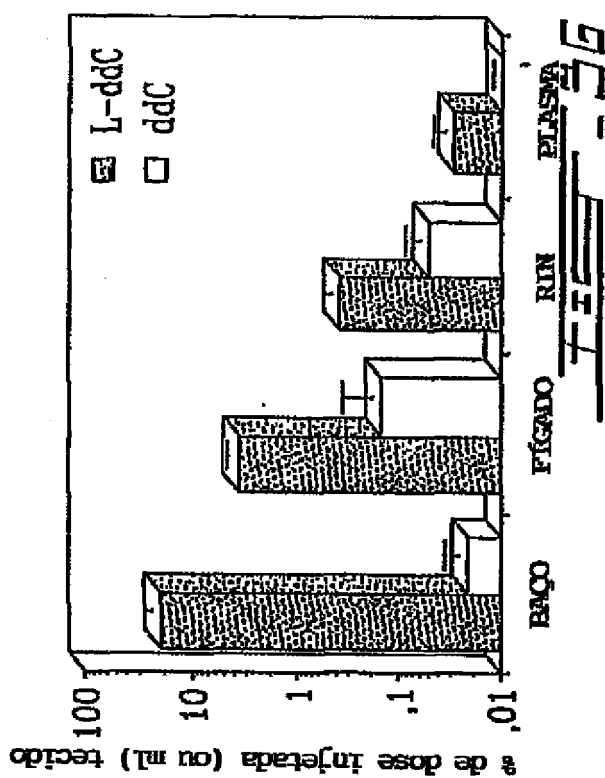


FIS-30

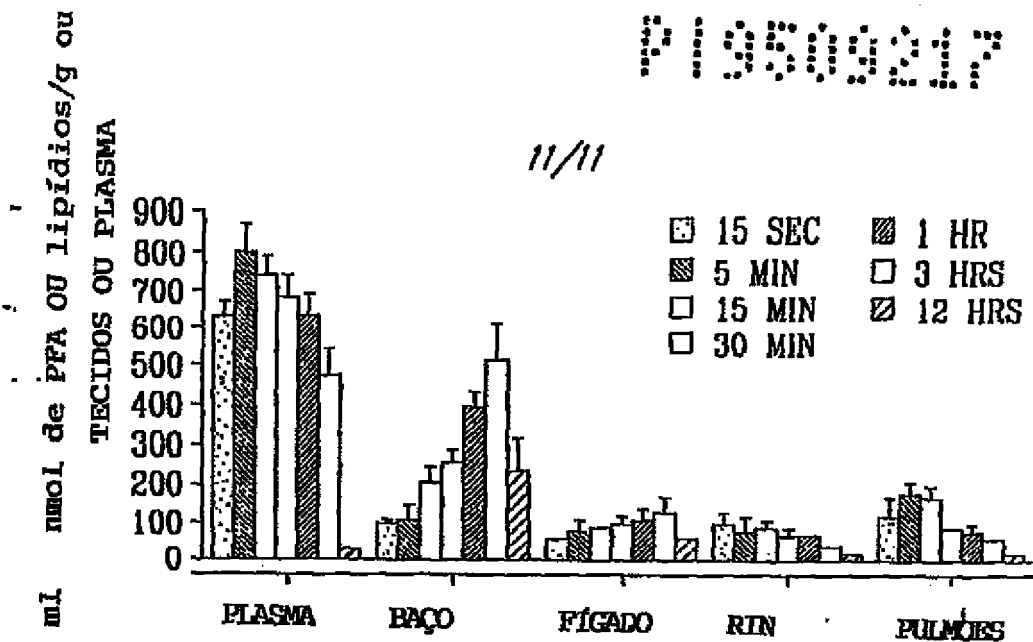


FIS-3E

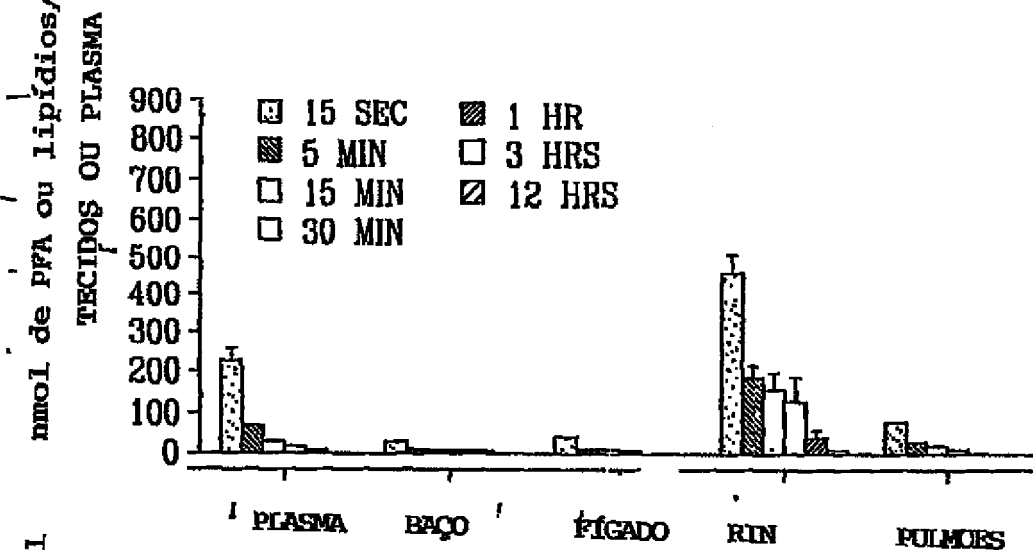
10/11



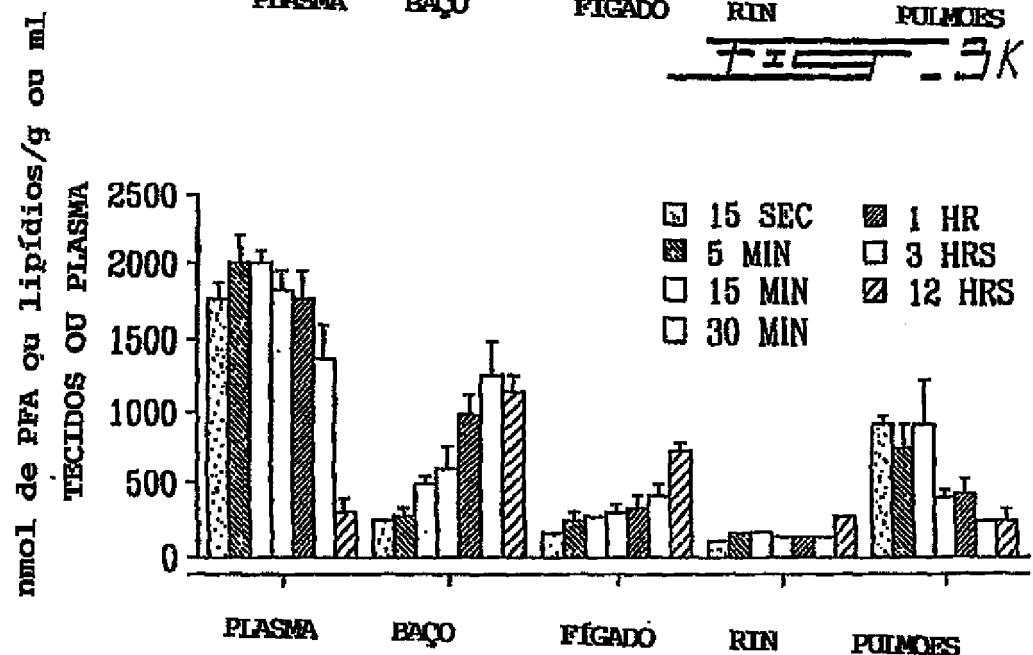
11/11



FEI-3J



FEI-3K



FEI-3L

RESUMO

Patente de Invenção para
"PROCESSO E FORMULAÇÕES PARA TRATAMENTO DE AIDS E
VARIAS OUTRAS DOENÇAS VIRAIS".

05 Um processo é revelado para
o tratamento de doenças virais compreendendo a
administração de agentes antivirais encapsulados em
liposomas. Também provido são formulações de
liposomas para o tratamento de doenças virais, e,
10 mais particularmente, para o tratamento de infecções
causadas por viroses similares ao vírus da
imunodeficiência humana (HIV) e citomegalovirus
(CMV). Estas formulações de liposomas são compostas
de classes específicas de componentes de lipídeo, e
15 contém uma droga presa efetiva contra a doença
viral. Estas formulações liposomais de drogas
antivirais permitem alta penetração celular em
linhas de células diferentes, boa eficácia antiviral
in vitro contra duplicação de HIV e CMV, eficiente
20 objetivação in vivo de reservatórios de HIV, e um
aperfeiçoamento marcado nas farmacocinéticas de
drogas.